中華農業研究 (Jour. agric. Res. China) 30(3)：332～339 (1981)

洋菇腫柄病菌厚膜孢子之發芽及對本病發生之影響[1]

廖 英 明[2]

摘要：以不同處理方式來促進洋菇腫柄病菌（*Mycogone perniciosa* Magn.）厚膜孢子發芽，結果顯示以化學藥物處理，溫度處理及酸鹼處理均無法促使其在人工培養基中發芽。但若置於充滿洋菇菌絲代謝所產生之揮發性氣體之空間，則於 PDA 培養基上厚膜孢子在 16°～28°C 均可發芽，而 24°C 爲最適合發芽之溫度，3 個月齡期之厚膜孢子爲最適合發芽之時期。厚膜孢子在培養 24 小時內很少發芽，且 12°C 以下及 32°C 以上均不發芽，發芽率在 1～14 %之間；厚膜孢子發芽管由下方之 Cell 中伸出，可有 1 支或 2 支，而後迅速分支或長出一段時間後再分支，約在培養 96 小時後，厚膜孢子之內含物全部脫離而轉移至發芽管，剩下一空殼。若將厚膜孢子接種於覆土中，則在第 20 天即可產生具有病徵型之洋菇子實體，且有二種病徵型存在。

洋菇腫柄病爲洋菇栽培中重要病害之一，發生嚴重時幾無收成，影響農民收益至鉅。目前對該病之防治僅能以藥劑來加以抑制，但效果並不理想。近期中，國外有關該病之防治方式，許多學者均有不同之結果 (6,11,12,13,18,19,21,23)。國內對該病之防治報告，有杜氏 (1,2) 認爲 125 ppm 之 Benlate 在 3.3m² 之菇床使用 1,000cc 時有良好的治療及預防效果，及洪氏 (3) 指出大生 M-22 之防治效果良好且無藥害發生。惟最近徐氏 (4) 之報告指出本省目前腫柄病發生極爲嚴重，藥劑已無法有效控制，而懷疑係本病菌已產生抗藥性。因此在對該病整個生態方面必須再加以重新瞭解，尤其是在該病之殘存及傳佈上更值得注意。該病之感染源主要來自覆土 (6,10)，而厚膜孢子可能爲其殘存方式。因此厚膜孢子之存在已決定了整個病害發生程度，而厚膜孢子如何進行發芽也成爲整個病害發生的重點。本病菌 *Mycogone perniciosa* 爲不完全菌，其有性世代可能爲 *Histoplasma capsulatum* (5,7) 後者爲一種動物寄生菌，可引起 Histoplasmosis 病。而 *M. perniciosa* 可產生二種型式之孢子，一種爲透明無色之 phialospore 另一種即爲厚壁之 aleuriospore 或 chlamydospore (7)。殘存時以厚膜孢子狀態存在於覆土中，堆肥或其他器具上，主要由水傳播，少部份由風及其他方式傳播，待於菇床栽培時則發芽而後擴展。導致整個洋菇子實體罹病。過去對該菌厚膜孢子之發芽均未見報告，而其發芽過程也未明瞭；而一般促進孢子發芽的方式有許多種類，Weber 氏等 (22) 在 "The fungal spore" 一書中提到的有：如以 Tween 20 處理可促進 *Colletotrichum trifollii* 孢子發芽；furans 及 thiophenes, pyrrole 等可促促進 *Neurospora* spp. 之 ascospore 發芽；另外 *Coprinus radiatus* 之孢子需要 44～46°C 4 小時之熱處理及 furfural 之處理才達到最高的發芽率；而以 isovalerate 及 isoamyl alcohol 處理 *Agaricus bisporus* 亦可促進其孢子之發芽，另外還有許多處理方式，不外化學及物理之刺激方式。本研究即在探討厚膜孢子發芽的過程及外在因素對厚膜孢子發芽之影響，以作爲日後研擬該病防治方法之參考。

---

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 1007 號。本試驗承吳正球先生及廖莉莉小姐之協助，謹此申謝。

2. 本所植物病理系助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

材料及方法

一、病菌之來源：將採自名間鄉菇床之洋菇罹病子實體，切取病組織移殖於馬鈴薯洋菜培養基中，於 24°C 下培養。待其長出腫柄病菌之菌絲後，挑取菌落邊緣部份之菌絲塊，保存於試管斜面內，經過不同時間後分別挑取厚膜孢子作爲發芽試驗用。

二、厚膜孢子發芽促進試驗：由培養基斜面中刮取厚膜孢子後置於無菌水中，在 45°C 下處理10分鐘，將殘留之菌絲片斷去除。

1.化學藥物處理：以吡咯啶甲酸（proline 5×10^{-3}M）及甘醇（ethyl glycol），蔗糖（sucrose），、澱蘆糖（trehalose），木糖（xylose）乙醇（ethanol），甲醇（methanol），氫氧化鈉（NaOH 1N），鹽酸（Hcl 0.1N），丙酮（acetone）、醋酸（acetic acid）、異戊酸（isovaleric acid）及異戊醇（isoamyl alcohol），乙醚（ethyl ether），苯（benzene），正乙烷（hexane）等各 0.1M 加於 PDA 養培基中，再移入不同齡期（6、5、4、3、2、1 個月齡）之厚膜孢子懸浮液，而後置於 24°C 之定溫箱中，觀察其發芽情形。

2.溫湯處理：將厚膜孢子懸浮液在各種不同溫度下作不同時間之處理，即在恆溫槽中於 70°C 下處理5分鐘，60°C 下處理 10 分鐘，50°C 下處理15分鐘，40°C 下處理 30 分鐘，並依照前項之方法將厚膜孢子懸浮液倒於 PDA 培養基平板中，置於 24°C 下觀察其發芽情形。

3.酸鹼處理：將 PDA 培養基以 0.1N Hcl 及 1N NaOH 調整其 pH 值爲 3.0、3.5、4.0、4、5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 及 9.0 等不同酸碱度，此種酸碱度爲未經殺菌前之值，殺菌後之變化爲降低 pH 值0.2~0.3，而後將不同齡期之厚膜孢子懸浮液加於 PDA 平板上，置於 24°C 下，在 24~96 小時內觀察其厚膜孢子之發芽情形。

4.不同培養基之處理：將不同齡期之厚膜孢子加於下列培養中，置於 24°C 下培養，並觀察厚膜孢子之發芽情形，各培養基之配方如下：potato dextrose agar (potato 200g；dextrose 20g；agar 20g；distilled water 1 litre), compost agar (dry compost 25g；agar 20g；distilled water 1 litre), nutrient agar (nutrient broth pH7.2 1 litre； agar 15g), GMY medium (glucose 10g；malt extract 10g；yeast extract 4g；distilled water 1 litre), soil extract agar (agar 15g；glucose 1.0g, K_2HPO_4 0.5g；soil extract 100ml；distilled water 900ml), potato sucrose agar (potato 200g；sucrose 20g；agar 20g；distilled water 1 litre)。

三、洋菇代謝氣體對厚膜孢子發芽之影響：以不同齡期之厚膜孢子塗抹於上置 water agar 或 PDA 之載玻片上，而後置於經消毒之半密閉玻璃盒中（圖1），外罩以塑膠袋，並以橡皮管和菌種瓶相連通；菌種瓶則內置麥粒或堆肥菌種，瓶口以打洞之橡皮塞塞住，孔中放入彎曲之玻璃管，玻璃管一頭和橡皮管連接。經過不同培養時間後取出載玻片，觀察其厚膜孢子發芽情形，外置一組玻璃盒不連接菌種瓶作爲對照之用。又以同樣之設置，將內置堆肥及麥粒之菌種瓶及玻璃盒放置於不同溫度下（12、16、20、24、28 及 32°C），另置對照組不與菌種瓶相連接，放置於相同處理之溫度下，於一定時間內觀察其發芽情形。

四、厚膜孢子接種試驗及腫柄病發生頻度：將厚膜孢子懸浮液 150,000個／20ml 與4公斤覆土混合施用於 0.135m^2 之栽培盆中，計4重複，另置一不加厚膜孢子之覆土作爲對照，覆土首先經60°C，24小時後之處理，並按一般洋菇栽培法栽培，並調查其腫柄病發生情形，及其對產量之影響。

結　　果

一、腫柄病菌之培養觀察

將菌絲塊接種於 PDA 培養基平板中，約5至7天內可見其瓶狀枝及瓶狀枝孢子，及少部份之厚膜孢子；厚膜孢子與瓶狀枝孢子（分生孢子）可同時存在於同一菌落中，瓶狀枝孢子大小爲 11~

20×2.5～5μm，通常有一節，且極易發芽，若繼續培養於 24°C 下，則約 10 天後即可見多量之厚膜孢子產生，厚膜孢子大小爲 13～30×16～35μm，厚膜孢子通常由二部份構成，即上方之臘質，具突起及顏色之大型細胞 (cell)，和下方之平滑細胞 (cell) (圖2)。當厚膜孢子脫離菌絲或老化時，下方之細胞則成一空殼而附著於上方細胞；於培養20天後則菌絲開始老化死亡，厚膜孢子大量產生，30 天後菌絲幾乎完全瓦解，僅餘厚膜孢子。

圖 1. 厚膜孢子之發芽試驗（左，未處理；中，與堆肥菌種相連接；右，與麥粒菌種相連接）。

Fig. 1. Treatments for the germination test of chlamydospore of *M. perniciosa*. (left, non-treated control; middle, connected to a compost spawn; right, connected to a wheat grain spawn of mushroom).

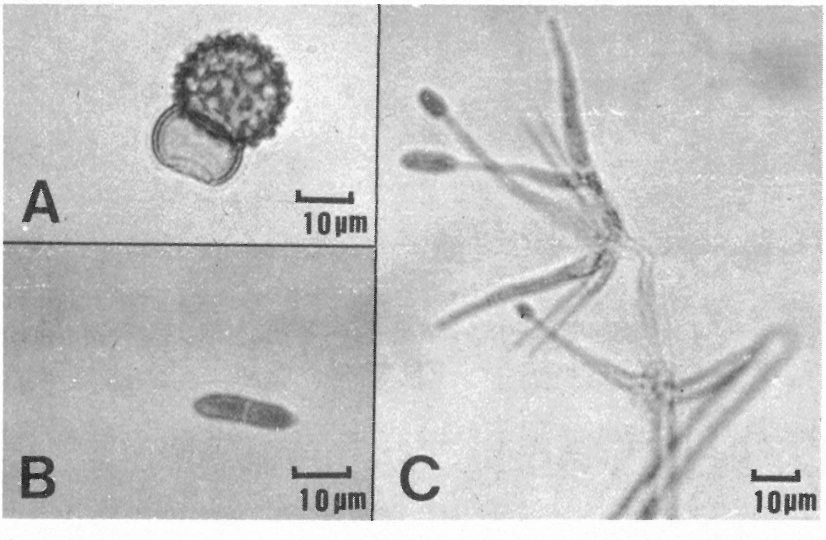

圖 2. *Mycogone perniciosa* 之厚膜孢子 (A)；瓶狀枝孢子 (B) 及瓶狀枝與瓶狀枝孢子 (C)

Fig. 2. *Mycogone perniciosa*: chlamydospore (A); phialospore (B) and phialides with phialospore (C).

二、溫湯處理對厚膜孢子發芽之促進

厚膜孢子懸浮液經 45°C 處理 10 分鐘後，於顯微鏡下染色觀察時，未見有可染色之菌絲段。而不同齡期之厚膜孢子在經過處理培養後經 5 、10、15及 20 天均無法得到發芽之厚膜孢子，這些處理包括不同化學藥品，不同酸鹼度，不同培養基及不同溫度之處理。厚膜孢子在 70°C 下處理時有部份死亡現象 60°C 下處理亦有少數死亡，但 50°C 下處理則未見死亡。

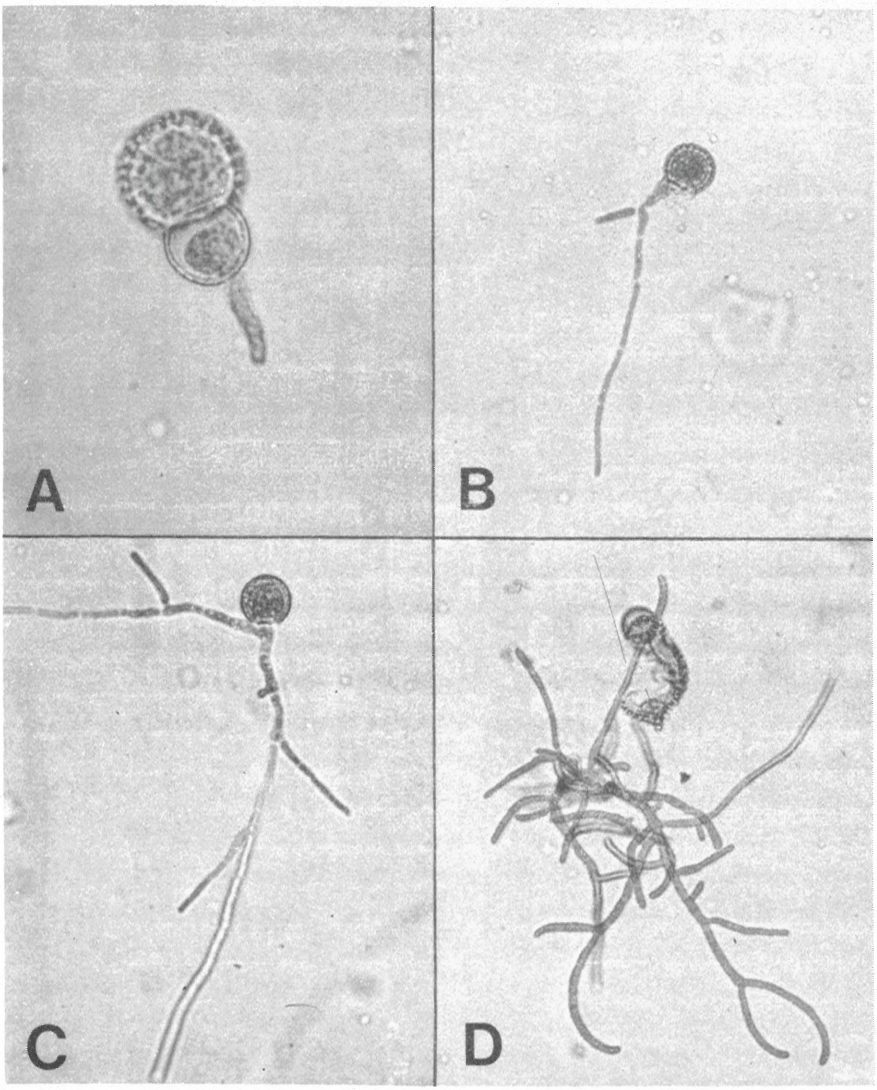

圖 3. 不同培養時期之厚膜孢子其發芽情形（A, 48 小時；B, 64 小時；C, 72 小時；D, 96 小時之培養時間）。

Fig. 3. The germination of chlamydospores of *M. perniciosa*. (A, 48hrs ; B, 64hrs ; C, 72hrs ; D, 96hrs after incubation).

三、洋菇代謝氣體對厚膜孢子發芽之影響

由此種處理方式可得部份厚膜孢子之發芽，即在 water agar 及 PDA 中均可發芽，但在 water agar 中發芽管無法伸長。而連接於堆肥及麥粒菌種中均可發芽， 厚膜孢子之發芽過程如圖 3 所示，首先由厚膜孢子下方之 cell 中伸出發芽管，發芽管有 1 支或 2 支，未見有 3 支以上者。發芽管可迅速

分支或長出一段後再分支，發芽管伸長成爲菌絲而後擴展，最後整個內含物脫離厚膜孢子，而後厚膜孢子剩下一空殼而後瓦解，而不同齡期之厚膜孢子亦有不同的發芽程度，以 3 個月齡爲最適宜發芽，1 個月以下或 6 個月以上較不適宜發芽（表 1）。而由表 1 可知有部分的厚膜孢子會自行死亡，即以 cotton blue 無法加以染色，因此這些死亡之厚膜孢子並不列入發芽率之計算。在不同溫度下培養發現 16～28°C 均適合發芽，而以 24°C 爲最適合，12 及 32°C 下則不發芽，但發芽率仍爲偏低，在 1～14%之間，各不同溫度之發芽率詳列於表 2。

表 1. 不同齡期對厚膜孢子發芽之影響

Table 1. Germination of different ages of chlamydospores of *M. perniciosa* on PDA

齡期（月） Age (month)	死亡數[a] Dead chlamydospore	發芽數[a] Germinated chlamydospore	相對發芽率[a] Percentage of germination (%)
6	70	86	9.2
5	65	99	1.5
4	51	105	11.1
3	31	136	14.1
2	16	74	7.5
1	10	16	1.8

a. 此爲 1,000 個厚膜孢子之觀察結果。
The result of observance on one thousand of chlamydospores.

表 2. 溫度對不同年齡厚膜孢子發芽之影響

Table 2. Effect of temperature on the germination of chlamydospores of *M. perniciosa*

齡期（月） Age (month)	發芽率 (%) Percentage of germination at					
	12°C	16°C	20°C	24°C	28°C	32°C
6	0	0.3	2.1	7.6	4.1	0
5	0	3.4	4.4	9.3	3.3	0
4	0	4.2	5.2	11.4	4.2	0
3	0	8.3	12.2	14.2	8.1	0
2	0	2.0	3.8	6.3	5.8	0
1	0	0.1	1.2	2.0	0.2	0

四、腫柄病在菇床之發生頻度及對產量之影響

接種試驗結果顯示不加厚膜孢子之對照組均未見有腫柄病之病徵，而於接種厚膜孢子之栽培盆中可得到二種病徵型，一爲產生單一個體腫柄而後有褐色滴液出現者，另一爲產生一種 sclerodermoid masses 之聚生腫柄子實體，後者之病徵 Fletcher 氏曾指出其爲普遍存在[11]，而本試驗中發現僅有少數發生。經過不同時期之調查結果詳列於表 3，表中接種天數係以 7 天爲一單位來計算其產量及發生情形。接種後發病的程度佔總個體數的 16 %，佔總產量之 32 %，因此可知腫柄爲害仍爲嚴重且在栽培初期較易發生。由接種試驗結果可推斷腫柄病之發生係自厚膜孢子之發芽後產生感染菌絲再爲害洋菇子實體，厚膜孢子可謂該病發生之第一感染源。

表 3. 腫柄病在菇床上之發生頻度及產生量

Table 3. Incidience and yield of bubbles on bed

接種後天數 Days after inoculation	健全子實體 Healthy sporophores		感染子實體 Infected sporophres					
	重量 (g)	數目	腫柄 Stips		聚生 Sclorodermoid mass		百分比 %	
	Wt. (g)	Number	Wt. (g)	No.	Wt. (g)	No.	Wt.(g)	No.
20	124	12	38	3	0	0	24	20
27	382	35	66	4	176	3	39	17
34	71	8	88	5	0	0	55	38
41	306	27	62	3	0	0	17	10
48	46	7	19	2	60	2	63	36
55	142	16	35	1	0	0	20	6
62	138	17	17	1	0	0	11	6
total	1,209	122	325	19	236	5	32	16
not incoulated	1,837	198	0	0	0	0	0	0

討論

由本試驗知，厚膜孢子的發芽和氣體有密切的關係存在，且厚膜孢子的齡期 (age) 亦為一重要的因素，當 chlamydospore 太年輕或太老時其發芽率均不高，2～4 個月為最適合發芽之時期。至於何種氣體或何種氣體比例濃度下才會促使其發芽，及為何 3 個月齡之厚膜孢子其發芽率最高，必須作進一步試驗才可獲知。厚膜孢子發芽後如何擴展及其與洋菇菌絲間的關係如何均是未來工作之方向，如能對這些問題加以瞭解，則有助於未來的防治工作。在整個試驗過程中得知，最適合發芽之條件為選取 3 個月齡之厚膜孢子置於洋菇菌絲呼吸之氣體下，於 24°C 下培養，經 2～4 天取出觀察即可見厚膜孢子之發芽現象，但亦曾發現對照組之厚膜孢子並未在氣體刺激下，仍有極少部分之發芽現象，此點有待進一步的證明。而從發芽管伸出到整個厚膜孢子外殼脫落過程所需時間為培養 36 至 96 小時後，且各厚膜孢子所需時間差異不大。在 *Mycogone perniciosa* 之可能有性世代 *Histoplasma capsulatum* 其 macroconidia 之發芽條件為 30°C，pH 在 6.5～8.0 之間，濕度 100 %，而且在 cystine-dextrose blood agar 下才適於其發芽 [15]，其發芽條件和本試驗之厚膜孢子發芽方式不同。在接種試驗時，厚膜孢子與覆土混合並調整其含水量在 30 %，放置於室內一天後再進行接種，於第 20 天開始即出現可見之病徵，且有二種病徵型出現，而據 Fletcher 氏等指出由侵入到病徵出現所需的時間為 7～13 天 [11]， 因此可知厚膜孢子混合於覆土後，在極短時間內即可發芽蔓延，而腫柄病在第二週期後發現罹病情形較少、其原因可能為厚膜孢子須經一段時間之休眠，而短時間內無法作第二次感染。在對照組中，不加入厚膜孢子則無法產生病徵，由此可知厚膜孢子為病害發生之第一感染源，而腫柄病之殘存亦以厚膜孢子方式來存在於土壤中。因此可知 *M. perniciosa* 之發芽條件較為特殊，而厚膜孢子的發芽過程中，發芽管由下方之細胞中伸出，且發芽管由同一部位伸出一支以上，是否在同一部位具有許多發芽孔或同一發芽孔同時伸出二支發芽管，此點須作電子顯微鏡之觀察來作進一步證明。

引 用 文 獻

1. 杜自彊、金祥蓮・1963・洋菇腫柄褐痘病之研究（1）・臺灣區第四屆洋菇學術討論會報告：231-238。
2. 杜自彊、洪忠和・1971・洋菇褐痘病之研究・農業研究 20（3）：54-65。
3. 洪錦平・1969・洋菇褐痘病藥劑防治試驗・臺灣區第二屆洋菇學術討論會報告：317-321。
4. 徐鴻臯・1980・洋菇腫柄病新防治藥劑之篩選及病原菌抗藥性之研究（摘要）・臺灣區洋菇試驗研究及生產改進計畫報告第六輯：303～304。
5. Ajello, and S. L. Cheng. 1967. Sexual reproduction in *Histoplasma capsulatum*. Mycologia 59 : 689-697.
6. Atkins, P. andF. C. Atkins. 1971. Major disease of the cultivated white mushroom. : 9-12.
7. Barnett, H. L. 1955. Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis ; Burgess Publishing Co.
8. Cross, M. J. and Jacobs, L. 1969. *Verticillium* and *Mycogone* disease of the mushroom. M. G. A. Bull. No. 238 ; 440-442.
9. Dough, T. C. 1976. Chemical control of the bubble disease of cultivated mushrooms. Proceedings of the Fith Symposium on mushroom Research and Improvement of Production. : 281-286.
10. Fekete, K. and Kuhn, J. 1966. Vertomyc, a new fungicide for the control of *Verticillium* and *Mycogone*. Champignon 6(59) : 16-22.
11. Fletcher, J. T. and Ganney, G. W. 1969. Experiments on the biology and control of *Mycogone perniciosa* Magn. Mushroom Sci. 7 : 221-237.
12. Fletcher, J. T. ; Connolly, G. ; Mountfield, E. I. and Jacobs, L. The disapperance of benomyl from mushroom casing. Annals of Applied Biology (1980) 95(1) : 73-82.
13. Gandy, D. G. and Spencer, D. M. 1978. Fungicides for the control of *Mycogone perniciosa* (Magn.), the cause of wet bubble on the cultivated mushroom. Scientia Horticulturae 8(4) : 307-313.
14. Ganney, G. W. and Fletcher, J. T. 1968. Summary of experiments on the bioligy and control of the mushroom disease *Mycogone perniciosa*. M. G. A. Bull. No. 224 ; 413-418.
15. Goos, R. D. 1964. Germination of the maroconidium of *Histoplasma capsulatum*. Mycologia. 56 ; 662-671.
16. Jacobs, L. 1965. Preliminary studies of the bubble of mushroom. M. G. A. Bull. 185 : 203-204.
17. Lambert, E. B. 1930. Studies on the relation of temperature to the growth, parasitism, thermal death points and control of *M. perniciosa*. Phytopathology 20 : 75-83.
18. Nair, N. G. and Baker, H. J. 1978. Studies on the control of wet bubble disease of mushroom with benzimidales. Austr. Jour. Agric. Res. 29(3) : 545-553.
19. Newman, R. H. and Savidge, M. 1969. Mancozeb dust. M. G. A. Bull. 232 : 161-162.
20. Sinden, J. W. 1971. Ecological control of pathogens and weed-molds in mushroom culture. Ann. Rev. Phytopathology 9 : 411-431.
21. Snel, M. and Fletcher, J. T. 1971. Benomyl thiabendzaole for the control of mushroom diseases. Plant Dis. Reptr. 55 : 120-121.
22. Weber, D. J. and Hess, W. M. 1975. The fungal spore. 895 pp.
23. Wuest, P. J. ; Baker, K. F. and Conway, W. S. 1970. Sensitivity of selected mushroom pathogens to aerated steam . Phytopathology 60 : 1274-1275.

The chlamydospore germination of *Mycogone perniciosa* and its effect on the occurrence of wet bubble of mushroom on the bed[1]

Ying-ming Liao[2]

Summary

Chlamydospores of *Mycogone perniciosa*, the causal organism of wet bubble of mushroom, did not germinate on different media in the laboratory, not even treated with heat (40 to 70°C), chemicals and/or organic solvents. However, the germination was observed on potato dextrose agar connected to the gas produced by the mycelia of mushroom in compost 36 hours at 24°C. The maximum percentage of germination, i. e. 14%, was recorded 48 hours at 24°C on 3-month-old chlamydospores. No germination was observed when the temperature was lower than 12 or higher than 32°C. One or two germ tubes were produced from the low cell of chlamydospore. Ninety-six hours after incubation, the cell content of chlamydospore completely moved into the germ tubes leaving an empty cell. When chlamydospores were incorported into the casing soil on the bed, bubble mushroom which is the typical symptom were produced. Therefore, the germination of the chlamydospore of *M. perniciosa* may be, in part, stimulated by the gas produced by the mycelia of mushroom and/or the complex of the mycelia and the growth media.

---

1. Contribution No. 1007 from the Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Assistant Plant Pathologist, Department of Plant Pathology. TARI. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431, ROC.